

平成22年 5月28日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20770156  
 研究課題名 (和文) ミトコンドリア形態制御に関与する新しい分子の分子細胞生物学的な解析

研究課題名 (英文) Functional characterization of novel proteins involved in mitochondrial dynamics

研究代表者  
 中村 信大 (NAKAMURA NOBUHIRO)  
 東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教  
 研究者番号：80361765

## 研究成果の概要 (和文)：

本研究では、①ヒトの新規ミトコンドリア脱ユビキチン化酵素 USP30 の酵素活性がミトコンドリア形態の維持に必要であることを RNA 干渉法による発現抑制およびそのレスキュー解析から明らかにし、②マウス GGNBP1 が分化途中の精子細胞に特異的に発現するミトコンドリアタンパク質であり、分裂因子 Drp1 に依存してミトコンドリアの分裂を誘導することを明らかにした。以上の結果から、哺乳動物におけるミトコンドリア形態制御の分子機構の一端を明らかにした。

## 研究成果の概要 (英文)：

This study has demonstrated that 1) an enzymatic activity of human USP30, a novel mitochondrial deubiquitinating enzyme, is required for maintenance of mitochondrial morphology, and 2) mouse GGNBP1 is highly expressed in spermatogenic cells and induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. These results provide better understand of the molecular mechanism of mitochondrial dynamics.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

## 研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・細胞生物学

キーワード：細胞構造・機能，ミトコンドリア，ユビキチン，精子形成

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞の分化・増殖・応答に伴い、柔軟な形・数・分布の変化をする動的なオルガネラである。この形態調節の鍵となる分子としてミトコンドリア膜の融合因子

や分裂因子が同定されている。絶えず融合と分裂を繰り返すミトコンドリアの膜構造の動的変化は、これらの因子の活性のバランスで制御されているが、その活性調節機構については不明な点が多く、ミトコンドリア形態制御の分子基盤の全体像は把握されていな

い。ミトコンドリア形態はエネルギー代謝、Ca<sup>2+</sup>シグナリング、アポトーシスなどの様々な細胞機能に密接な関連があるばかりでなく、最近では、ミトコンドリアの形態調節の異常が神経変性疾患に関連することが示されている。このように、細胞生物学・生理学・医学分野における様々な未解決の問題を内包するミトコンドリアダイナミクスの基礎解析の重要性は増しつつある。私は先行研究により、ミトコンドリアの形態維持に極めて重要であるユビキチン化酵素 MARCH5 の同定に成功した。さらに、新型のミトコンドリア脱ユビキチン化酵素 (USP30) も同定し、ミトコンドリア機能がユビキチン化によって制御される可能性を見出した。また、新たなミトコンドリア形態制御因子 (GGNBP1) の同定にも成功した。本研究では、これら新規ミトコンドリア分子群の機能解析を行い、ミトコンドリアの形態調節における役割とその作用機序について、主にユビキチン化の関与を中心に明らかにすることを目標とした。

## 2. 研究の目的

(1) 酵母の遺伝学的解析からユビキチン・プロテアソーム系の分子のミトコンドリア形態制御への関与が示唆されていたが、ユビキチン化酵素やその基質分子の実体は長い間不明であった。私は MARCH5 が哺乳動物細胞のミトコンドリア外膜に存在する E3 ユビキチンリガーゼであり、Mfn2 (融合因子) と Drp1 (分裂因子) と相互作用することを明らかにした。さらに、Drp1 が MARCH5 のユビキチン化の基質分子であることを明らかにした。さらに、MARCH5 の過剰発現ではミトコンドリアが伸長し、E3 活性を失った変異体を発現させると逆に断片化を誘導することが分かった。以上の結果は、ミトコンドリアの融合・分裂反応の調節にユビキチン化が深く関与することを示すものと考えられる。リン酸化と同様にユビキチン化の機能は脱ユビキチン化によって負に制御されることが知られている。この脱ユビキチン化を触媒するのが脱ユビキチン化酵素である。さらに、先行研究によってミトコンドリア外膜の脱ユビキチン化酵素 USP30 を同定し、その発現がミトコンドリア形態維持に重要であることを認めた。そこで本研究課題では、ミトコンドリアダイナミクスにおけるユビキチン化の重要性を明らかにするため、USP30 の活性がミトコンドリア形態維持に必要であることを証明し、融合・分裂因子のユビキチン化状態への影響を調べて融合・分裂反応への関与について検討した。また、USP30 の基質分子の探索を行った。

(2) 先行研究において、既知の融合・分裂因子以外にミトコンドリア形態に影響を及ぼす分子のスクリーニングを行った結果、ミトコンドリア形態調節因子の候補分子 GGNBP1 の同定に成功した。培養細胞における過剰発現の解析から GGNBP1 はミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアの断片化を誘導することを認めた。この断片化のメカニズムについて、GGNBP1 が単独で分裂因子として働くのか、Drp1 や Fis1 の補助分子ないしは融合因子の阻害分子として機能するかははっきりしていないので本研究で明らかにすることを目標にした。さらに、GGNBP1 の基本的性質 (組織発現・細胞発現の特定) を明らかにし、ミトコンドリア断片化のメカニズムと細胞機能について説明できるようにすることを目的とした。また、部位欠失変異体の解析から、GGNBP1 のミトコンドリア移行または断片化のメカニズムの解明を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア形態における脱ユビキチン化酵素活性の重要性を明らかにする。

ヒト USP30 を発現抑制できる二本鎖 RNA を恒常的に発現する HeLa 細胞株を 2 クローン作製し、これらの細胞では異常に発達したミトコンドリアネットワークを形成していることを確認した。これらの細胞株に発現抑制を受けないラット USP30 遺伝子を導入した時に、ミトコンドリアの形態が回復するか検討した (レスキュー実験)。また、脱ユビキチン化活性を失った変異体を代わりに導入し、もし脱ユビキチン化活性がミトコンドリア形態維持に必要であればレスキューされないはずであるので確認した。

(2) USP30 の基質の探索。

脱ユビキチン化活性とミトコンドリアダイナミクスとの関連を調べるため、上記細胞株からミトコンドリア外膜の融合・分裂因子 (Mfn1, Mfn2, Drp1, Fis1) を免疫沈降し、抗ユビキチン抗体を用いてウエスタン解析を行いそれぞれの因子のユビキチン化状態に変化が生じていないか検討した。また、これらの因子が USP30 と相互作用するか培養細胞での共発現系を用いた免疫沈降実験で解析した。具体的には、FLAG タグ付きの USP30 および不活性型変異体を恒常的に発現する HeLa 細胞株からミトコンドリア画分を調整し、そのライセートより抗 FLAG 抗体ビーズによって USP30 を免疫沈降し、共沈してくるものがあれば MALDI-TOF Mass 解析により特定を試みた。また、酵母ツーハイブリッドシ

システムを用いて結合分子の探索を試みた。

(3) GGNBP1 の基本的な性質とミトコンドリア断片化の仕組みを明らかにする。

① マウス GGNBP1 の組織発現をノーザン解析により決定し、さらに、作製済みの抗 GGNBP1 抗体を用いて免疫組織染色を行い発現細胞の特定を行った。さらに、内在性の GGNBP1 のミトコンドリア局在について、精巣抽出液を用いたショ糖密度勾配遠心による細胞分画および精子細胞の蛍光抗体法によって確認した。さらに GGNBP1 のより詳細なミトコンドリア局在についても、発現組織（精巣）からミトコンドリアを調整してプロテアーゼ K プロテクションアッセイ法により確認した。

② GGNBP1 によるミトコンドリア断片化は分裂活性の促進によるものと考えられるが、これが分裂因子 Drp1 や Fis1 の活性に依存しているのか調べた。分裂因子を RNA 干渉により発現抑制した状態またはドミナントネガティブ変異体の強制発現した状態で、GGNBP1 を過剰発現させて断片化が起こらなければ分裂因子に依存的であるといえ、断片化が生ずれば非依存的であるといえる。

③ 先行研究の部位欠失変異体の解析から GGNBP1 の C 末領域がミトコンドリアの断片化活性を持つことを認めていた。さらに活性領域を絞っていくことで活性に重要な領域の特定を試みた。また、この C 末領域によく似た配列が幾つかの脱ユビキチン化酵素に認められるが機能的にも保存されているか調べるため、GGNBP1 の C 末領域を脱ユビキチン化酵素 (Usp15) の配列と置換したものを発現させてミトコンドリアの断片化が生じるか検討した。

#### 4. 研究成果

(1) ミトコンドリア外膜に局在する脱ユビキチン化酵素 USP30 の発現を抑制するとミトコンドリアの伸長を促進することを見出し、これが USP30 の酵素活性が重要であるかを解析した。USP30 の発現を RNAi により抑制した細胞に対して、正常型および酵素活性欠失型変異体の USP30 をそれぞれ過剰発現してミトコンドリア形態について観察した。その結果、正常型の発現によって正常なミトコンドリア形態を示したのに対して、変異体ではそのような回復が認められなかった。以上から、USP30 がミトコンドリア膜上でのユビキチン化を負に制御することによってミトコンド

リアの形態を調節しているという新しいメカニズムを提唱することができた。

(2) USP30 とミトコンドリア融合・分裂因子との相互作用を調べるために、USP30 およびその不活性型変異体をそれぞれ恒常的に発現する HeLa 細胞株を作製し、これらを用いた免疫沈降法により解析した。その結果、USP30 との相互作用は確認できなかった。また、これらの因子のユビキチン化状態について USP30 の活性の増強（過剰発現）または減少（RNAi または不活性型変異体の発現）によって影響を調べたが大きな変化は認められなかった。しかしながら、免疫沈降物の中には微量の共沈物と思われるバンドが確認されており、これらの分子を質量分析で特定すべく、実験系を再検討中である。

(3) マウスの新規ミトコンドリア形態制御因子 GGNBP1 の機能解析を行った。ノーザン解析・免疫組織染色によって GGNBP1 は精巣に多量に発現し、発生段階の精子細胞に特異的に発現していることが分かった。さらに、GGNBP1 は精子細胞内のミトコンドリアやミクロソーム膜に局在することを明らかにした。さらに、ミトコンドリアのプロテアーゼ K プロテクションアッセイ法により内在性 GGNBP1 はミトコンドリア膜間スペースに局在することが分かった。上皮系の培養細胞を用いた解析では、GGNBP1 は、分裂因子 Drp1 の活性に依存したミトコンドリアの断片化を促進することが分かった。さらに、部位欠失変異体の解析から、この断片化促進活性には DUB1055 ドメインを含む C 末領域が必要であることを明らかにした（図 1）。この領域を脱ユビキチン化酵素 Usp15 の DUB1055 ドメインと置換した場合、断片化反応は認められな

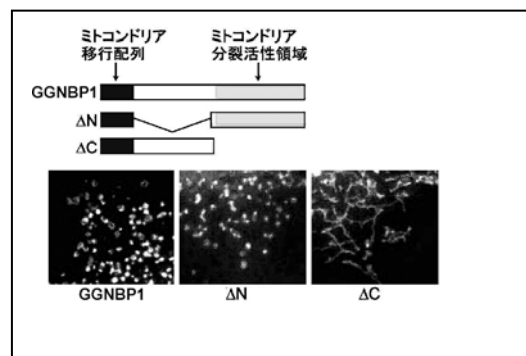


図 1. GGNBP1 および部位欠失変異体の構造模式図（上）。それぞれを COS7 細胞に強制発現したときのミトコンドリアの染色像（下）。C 末領域を含む場合（GGNBP1 と  $\Delta N$ ）にミトコンドリアの断片化が誘導された。

かったため、断片化能は GGGBP1 の DUB1055 ドメインに特異的な機能である可能性が考えられる。また、N 末端約 60 アミノ酸の部分がミトコンドリア移行に必要であることを明らかにした。精子細胞では精子形成時に必要なエネルギー供給を満たすためにミトコンドリアの数を増加させているが、恐らく GGGBP1 はミトコンドリア断片化反応を調節することによりミトコンドリアの数と形の制御に関与していることが考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Nakada T, Westhoff CM, Yamaguchi Y, Hyodo S, Li X, Muro T, Kato A, Nakamura N, Hirose S. “Rhesus glycoprotein p2 (Rhp2) is a novel member of the Rh family of ammonia transporters highly expressed in shark kidney.” (2010) **Journal of Biological Chemistry**. 285(4), 2653-2664. 査読あり

② Esaki M, Hoshijima K, Nakamura N, Munakata K, Tanaka M, Ookata K, Asakawa K, Kawakami K, Wang W, Weinberg ES, Hirose S. “Mechanism of development of ionocytes rich in vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in the skin of zebrafish larvae.” (2009) **Developmental Biology**. 329(1), 116-129. 査読あり

③ Aihara T, Nakamura N, Honda S, Hirose S. “A novel potential role for gametogenetin-binding protein 1 (GGGBP1) in mitochondrial morphogenesis during spermatogenesis in mice.” (2009) **Biology of Reproduction**. 80(4), 762-770. 査読あり

④ Nakamura N, Hirose S. (2008) Regulation of mitochondrial morphology by USP30, a deubiquitinating enzyme present in the mitochondrial outer membrane. **Molecular Biology of the Cell**. 19(5), 1903-1911. 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

① Nakamura N, Hirose S. “Regulation of mitochondrial morphology by USP30, a novel mitochondrial deubiquitinating enzyme” 第 60 回日本細胞生物学会大会 (2008 年 6 月 29 日・横浜)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hirose.bio.titech.ac.jp/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 信大 (NAKAMURA NOBUHIRO)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：80361765

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし